



# دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته باکتری شناسی پزشکی

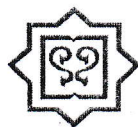
## عنوان:

مقایسه ایزوله‌های اشرشیاکولی جدا شده از عفونت‌های ادراری و فلور طبیعی مدفوع  
از نظر فاکتورهای بیماری‌زایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک و بررسی ارتباط کلونال  
ایزوله‌های ادراری با روش MLST

توسط: زهرا هاشمی زاده

استاد راهنما: دکتر شهلا منصوری - دکتر داود کلانتر نیستانی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶ - ۱۳۹۵



**Kerman University of Medical Sciences**  
**Faculty of Medicine**

**In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree**  
**(PhD)**

**Title:**

**Comparsion of *Eshershia coli* isolates from Urinary tract infection (UTIs)**  
**and normal fecal flora in respect to antibiotic resistance, virulence factors**  
**and determination of UTI isolates by MLST method.**

**By: Zahra Hashemizadeh**

**Supervisors:**

- 1- Prof. Shala Mansouri**
- 2- Dr. Davood Kalantar-Neyestanaki**

**Year: 2017**



**زمینه و هدف:** با توجه به اهمیت اشرشیاکولی بعنوان یکی از علل مهم عفونت ادراری و اینکه در این ناحیه بررسی بر روی فاکتورهای ویروالانس، گروه‌بندی فیلوژنی در ایزوله‌های جدا شده از ادرار و فلور طبیعی روده انجام نشده، این مطالعه صورت گرفت. هدف از این بررسی مقایسه ایزوله‌های ادراری و کومنسال روده‌ای از نظر الگوی مقاومت ضد میکروبی، تولید فاکتورهای ویروالانس و گروه‌بندی فیلوژنی، بررسی ارتباط ژنتیکی بین ایزوله‌های مولد بتالاکتامازهای با طیف گسترده از روش ERIC-PCR و Multi Locus Sequence Typing (MLST) در تعدادی از ایزوله‌های ادراری و مدفوعی است.

**روش بررسی:** این بررسی بر روی ۳۵۱ ایزوله اشرشیاکولی جدا شده از بیماران بستری (۱۰۰) و غیربستری (۱۵۱) مبتلا به عفونت ادراری و فلور نرمال مدفوعی (۱۰۰) در شهر کرمان انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای ۱۲ آنتی‌بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. از روش دیسک ترکیبی برای تعیین ESBLs، AmpC disk test برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده AmpC استفاده شد. فراوانی کرباپنمازها با روش فنوتیپی بررسی شد. فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز *bla<sub>OXA</sub>*، *bla<sub>SHV</sub>*، *bla<sub>TEM</sub>*، *bla<sub>CTX-M group 1,2,3,4</sub>*، *bla<sub>NDM</sub>*، *bla<sub>KPC</sub>* با PCR بررسی شد. از روش‌های فنوتاتیپی برای بررسی تشکیل بیوفیلم، تعیین هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز (MRHA)، هیدروفوبیسیته سطحی (CSH) و تولید همولیزین در محیط آگار خوندار استفاده شد. گروه‌بندی فیلوژنی و ژن‌های ویروالانس *sat*، *fimH*، *iutA*، *hly*، *cnf* و *kpsMTII* با روش PCR بررسی شدند. تعیین توالی برای برخی از ژن‌های مورد مطالعه انجام شد. از روش ERIC-PCR و MLST برای تایید و بررسی ارتباط ژنتیکی ایزوله‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** همه ایزوله‌ها حساس به کلیستین و ۹۷٪ حساس به ای‌می‌پنم بودند. درصد مقاومت چندگانه (MDR) در ایزوله‌های ادراری و فلور نرمال مدفوعی ۵۶/۶٪ بود. در این بررسی ۴۶/۴٪ ایزوله، تولیدکننده ESBLs بودند. میزان شیوع ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *bla<sub>OXA</sub>*، *bla<sub>TEM</sub>*، *bla<sub>CTX-M group 1</sub>* به ترتیب ۷۶٪، ۷۴/۸٪، ۱۲/۸٪، ۱/۲٪ بود. هیچکدام ایزوله‌ها دارای ژن‌های *bla<sub>KPC</sub>* و *bla<sub>NDM</sub>* نبودند. میزان شیوع AmpC، ۶/۷٪ بود. با تعیین توالی برای ژن‌های مورد بررسی سلیلاتیپ‌های آن *bla<sub>OXA1</sub>*، *bla<sub>SHV12</sub>*، *bla<sub>TEM1</sub>*، *bla<sub>CTX-M group 1</sub>* تایید شدند. تولید MRHA و همولیزین در ایزوله‌های جدا شده از ادرار در مقایسه با فلور نرمال مدفوعی بیشتر بود ( $P \leq 0.003$ ). شیوع ژن‌های ویروالانس به ترتیب

*fimH* (۹۴/۵٪)، *kpsMTII* (۶۶/۹٪)، *iutA* (۶۷/۸٪)، *sat* (۳۹٪)، *hlyA* (۲۳٪) و *cnf* (۲۱٪) بود. فراوانی گروه‌های فیلوژنی در گروه‌های A، B1، B2، D و A به ترتیب ۳۶/۷٪، ۳۱/۳٪، ۱۶/۲٪، ۱۵/۶٪ بود. گروه A و B1 در ایزوله‌های فلور مدفوعی، B2 و D در ایزوله‌های ادرای بیشترین شیوع را داشتند. در روش ERIC-PCR با در نظر گرفتن درصد شباهت (۷۰٪)، ۳۱ کلاستر و ۱۷ singleton بدست آمد. برای ۲۰ ایزوله اشرشیاکولی جدا شده از عفونت‌های ادراری دارای *blaCTX*-M بستری در بیمارستان، MLST انجام شد، که STهای (ST131, 90, 405, 922, 2083, 1664, 648, 101, 4443) که بدست آمد. توسط این دو روش (ERIC-PCR و MLST) الگوهای ژنتیکی متنوع در این منطقه بدست

آمد.

**نتیجه‌گیری:** در این بررسی مقاومت چندگانه در ایزوله‌های اشرشیاکولی در عفونت‌های ادراری و مدفوعی زیاد بود. با افزایش شیوع اشرشیاکولی تولیدکننده ESBLs نیاز به مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک و شناسایی منبع و انتشار ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وجود دارد. همچنین فاکتورهای معینی برای کلونیزاسیون و عفونت در میزبان لازم است و آنها معمولاً در سویه‌های بی‌طری‌زا و غیربیماری‌زا وجود دارد. سویه‌های که در گروه A و B1 قرار دارند دارای فاکتور ویرولان‌س پایین‌تری بوده و این فاکتورها را زمانی که شرایط به نفع انتشار آنها به دستگاه ادراری است، بدست می‌آورند و این برخلاف ایزوله‌هایی که در گروه B2 و D که بالقوه بیماری‌زا هستند، می‌باشد. با بررسی روش‌های تایپینگ مورد مطالعه الگوهای متنوع ژنتیکی بدست آمد.

**کلمات کلیدی:** مقاومت ضد میکروبی، ESBLs، AmpC، گروه‌بندی فیلوژنی، فاکتورهای ویرولان‌س، MLST



## Abstract

**Background and aim:** Due to the importance of *Escherichia coli* as an important cause of urinary tract infections (UTIs), and the fact that there are no studies on the virulence factors of the isolates from urinary tract infections with the isolates from commensal fecal flora has not been performed in this area this study was performed. The aim of this study was the comparison between UTI isolates and fecal flora in respect to antibacterial resistance patterns, production of various virulence factors, phylogenetic grouping and the clonal relationship of ESBL producing isolates by ERIC-PCR, and the Multi Locus Sequence Typing among a selected isolates from UTIS.

## Material & Method

This study was performed on 351 *E. coli* isolates from UTIs of inpatients (n=100), Outpatients (n=151) and normal fecal flora (n= 100) in Kerman. Resistance to 12 different antibacterial agents was determined by disc diffusion method. Combined disc method was used for determination of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs). AmpC-producing isolates were detected by AmpC disc method. To determine the genes for *bla*<sub>CTX-Mgroup1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> PCR method was performed, PCR- sequencing technique was used to detect the ESBL genes. Phenotyping method was used for determination of biofilm formation, mannose resistance haemagglutination (MRHA), cell surface hydrophobicity (CSH) and hemolysin production on sheep blood agar plates. phylogenetic grouping and Presence of the genes for *fimH*, *K<sub>PS</sub>MTII*, *iutA*, *sat*, *hlyA*, and *cnf1* was determined using PCR method. Clonal relationship of the ESBL positive isolates were evaluated by enterobacterial repetitive intragenic consensus-PCR (ERIC-PCR). Phylogenetic typing was performed by the PCR method. MLST method was performed on a selected isolates.

## Result

All the isolates were sensitive to colistin, and 97% were susceptible to imipenem. Multiple drug resistance (MDR) in UTI and fecal flora isolates was 56.6 %. ESBL phenotype was found in 46.4% of the isolates. The prevalence of *bla*<sub>CTX-Mgroup1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>OXA</sub>, was 76%, 74.8%, 1.2% and 12.8%. By sequencing of these genes the subtypes were determined as *bla*<sub>CTX-Mgroup1</sub>, *bla*<sub>TEM1</sub>, *bla*<sub>OXA1</sub>, and *bla*<sub>SHV12</sub>. AmpC was detected in 6.7% of the isolates. Isolates from UTIs showed a significantly higher prevalence of MRHA, and hemolysin production compared with fecal flora ( $P \leq 0.03$ ). Prevalence of virulence genes among 351 isolates were *fimH* (94.5%), *K<sub>PS</sub>MTII* (66.9%), *iutA* (67.8%), *sat* (39%), *hlyA* (23%) and *cnf1* (21%). The frequency of the isolates in the phylogenetic groups B2, D, A and B1 were 36.7%, 31.3%, 16.2% and 15.6%, respectively. The groups A and B1 were more prevalent in the isolates of fecal flora, while the

groups B2 and D were more common in the isolates from UTIs. In ERIC-PCR with a cut-off of 70%, 31 groups were detected. For 20 *E. coli* isolated from UTIs (Inpatients) positive for *bla*<sub>CTX-Mgroup1</sub>, MLST technique was performed, and the ST types, (ST131, 90, 405, 922, 2083, 1664, 648, 101, 4443, 744, 693 and ST361) were identified. ERIC PCR and MLST showed a diverse pattern.

### **Conclusion**

In this study the multiple drug resistant MDR in the UTIs infections was high. Attempts should be made to reduce this rate by controlling the inappropriate or abuse of these agents in the community, and continuous surveillance of emerging resistance traits.

The results suggests that the certain factors are necessary for the host colonization and infection and they are common in both virulent and non-virulent strains, and that the strains in the groups A and B1 having lower virulence factors must acquire these factors when the condition is in favor of their dissemination to the urinary tract. In contrast the isolates in the groups B2 and D that appear to be potentially virulent. This study were identified with ERIC PCR and MLST showed a diverse pattern.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, ESBLs, AmpC, phylogenetic grouping, virulence factor, MLST.